

На правах рукописи

УДК 577.29

ШАГИМАРДАНОВА ЕЛЕНА ИЛЬЯСОВНА

**СТРЕССОВЫЙ ОТВЕТ *HORDEUM VULGARE* В УСЛОВИЯХ
КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА**

03.01.04— биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2010

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии ФГАОУВПО "Казанский (Приволжский) федеральный университет".

Научный руководитель: Доктор биологических наук, профессор

Шарипова Маргарита Рашидовна

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук, профессор

Багаева Татьяна Вадимовна

(КФУ, Казань)

Доктор биологических наук, в.н.с.

Чернова Ольга Александровна

(КИББ РАН, Казань)

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук
Государственный научный центр Российской
Федерации – Институт медико-
биологических проблем (ГНЦ РФ – ИМБП
РАН). (г. Москва)

Защита диссертации состоится 30 сентября 2010 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете, 420008, г.Казань, ул.Кремлевская, 18, главное здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И.Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете

Автореферат разослан _____ 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
профессор



З.И.Абрамова

Актуальность проблемы. Успехи в области культивирования высших растений на борту космических летательных аппаратов стали основой разработок по внедрению живых растительных организмов в качестве компонентов систем жизнеобеспечения (СЖО) космических кораблей. Биологические СЖО будут основаны на биолого-физико-химическом круговороте веществ, что обеспечит автономность и относительную независимость от продолжительности космических миссий при освоении дальнего космоса. Для создания биологических СЖО необходима всесторонняя комплексная оценка реакций живых растений – будущих компонентов СЖО в условиях реального космического полета.

За последние 15 лет на борту орбитального комплекса (ОК) «Мир» и на борту Международной космической станции (МКС) проведено более 20 экспериментов по изучению роста и развития высших растений. Показано, что при использовании технологии, позволяющей максимально обеспечить потребности исследуемых организмов при выращивании в космической оранжерее, длительность цикла онтогенетического развития растений не зависит от условий космического полета. Морфологические и биометрические показатели высших растений в космическом полете не отличаются от таковых в наземных контрольных экспериментах. Однако, механизмы, лежащие в основе адаптации к столь нетипичной среде до сих пор неясны. Данные, полученные различными исследователями, варьируют. С одной стороны, они свидетельствуют об изменениях морфологии организмов растений и их свойств, нарушении организации некоторых биологических молекул (Paul et al., 2005; Cai et al., 2007). С другой стороны, многие исследователи заявляют о полном отсутствии изменений (Sychev et al., 2007; Zelenin et al., 2010). Таким образом, вопрос о стрессовом ответе растений и его природе в условиях космического полета остается открытым.

Целью работы явилось выяснение закономерностей экспрессии генов стрессового ответа ячменя *Hordeum vulgare* в условиях Международной

Космической Станции (МКС) и исследование ДНК повреждающего действия открытого космоса на покоящиеся формы высших растений.

Основные задачи исследования:

1. Исследовать транскриптом *H.vulgare* сорта Haruno Nijo в условиях выращивания растений на борту МКС.
2. Провести анализ экспрессии генов стрессового ответа *H.vulgare* сорта Haruno Nijo, выращенного на борту МКС в 2006 г.
3. Выявить уровень экспрессии генов стрессового ответа *H.vulgare* карликового сорта Akashinriki, после культивирования на борту МКС в 2008 г.
4. Выяснить воздействие открытого космоса на жизнеспособность покоящихся форм и стабильность генома растений.

Научная новизна. Научная новизна работы заключается в качественно новом уровне исследований геномного ответа растений на условия космического полета. Получены приоритетные данные об увеличении уровня транскрипции генов белков, участвующих в элиминации АФК из клеток растений ячменя *H. vulgare* сорта Haruno Nijo в условиях реального космического полета. Методами ДНК-микрочипов и биоинформатики впервые проведен системный анализ генов ячменя, экспрессия которых изменяется в ответ на условия космического полета. В ходе сходного эксперимента по культивированию карликового сорта Akashinriki показано отсутствие значимых изменений в экспрессии генов стрессового ответа. Впервые исследована выживаемость семян ячменя после экспозиции на внешней поверхности космической станции в условиях открытого космоса и показано отсутствие мутационных изменений в растениях первого поколения, полученных из этих семян. Полученные данные вносят вклад в понимание реакций живых организмов в ответ на условия космического полета.

Практическая значимость работы. Проведенные исследования являются основой для практического выращивания высших растений на борту космических кораблей. Получены приоритетные данные об индукции

развития окислительного стресса у растений на борту МКС. Отсутствие изменений в экспрессии генов стрессового ответа ячменя сорта Akashinriki делают его перспективным для дальнейшего использования в биологических экспериментах в космосе, включая разработку систем жизнеобеспечения. Высокая выживаемость покоящихся семян ячменя и отсутствие наследуемых мутационных изменений в условиях длительного экспонирования в открытом космическом пространстве делают растения ячменя потенциальными кандидатами в будущих полетах на дальние расстояния.

Положения, выносимые на защиту.

1. В условиях космического полета изменяется экспрессия более 1000 генов, вовлеченных в метаболизм аминокислот, ДНК репликацию, биосинтез белков, энергетический обмен, фотосинтез, транспорт, передачу сигналов и ответ на стресс у ячменя *H. vulgare*.
2. Культивирование ячменя *H. vulgare* сорта Haruno Nijo на борту МКС в 2006 г. привело к усилению транскрипции генов, отвечающих за элиминацию активных форм кислорода (АФК) в клетках растений.
3. Культивирование растений ячменя *H. vulgare* карликового сорта Akashinriki в 2008 г. не оказывало значительного влияния на экспрессию генов стрессового ответа.
4. Длительное экспонирование в условиях открытого космоса не вызывает генетических и фенотипических изменений растений при их долговременной экспозиции на стадии покоящихся семян.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на 37-ой Международной научной конференции “Cospar”(Montreal, Canada, 2008), II Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2008), XII Международной пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века» (Пущино, 2008), XVII Международном симпозиуме “Humans in Space” (Moscow, 2009), XIV Международной конференции, посвященной 20-летию партнерства между

Казанским государственным университетом и Гиссенским университетом им. Ю. Либиха (Kazan, 2009), XXIII Международной конференции «Японского общества биологических наук в космосе» (Тсукуба, Япония, 2009), IV Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009), конференциях НОЦ КГУ Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2008, 2009), итоговых научных конференциях Казанского государственного университета (2009, 2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано четырнадцать работ [1-14], в том числе две статьи в международных журналах [2, 4] и две статьи в российских журналах [1, 3]. Три работы удовлетворяют требованиям ВАК [1-3].

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность д.б.н. зав. лабораторией "Биологические системы жизнеобеспечения человека" В.Н. Сычеву и д.б.н., с.н.с М.А. Левинских за предоставление возможности проведения экспериментов на борту МКС; к.б.н. О.А. Гусеву за постоянную помощь в проведении экспериментов; профессору М. Сугимото (Исследовательский институт биоресурсов, Курашики, Япония) за предоставление биологических материалов для исследования и научные консультации, космонавтам П.В. Виноградову, О.Д. Кононенко, Ф.Н. Юрчихину, О.В. Котову, С. А. Волкову за превосходную работу на борту МКС, а также всему коллективу кафедры микробиологии КФУ.

Искреннюю признательность автор выражает научному руководителю профессору М.Р. Шариповой за внимательное отношение к работе и поддержку при написании диссертации.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 139 страницах машинописного текста, содержит 2 таблицы и 19 рисунков. Библиография содержит 239 наименования российских и зарубежных авторов.

Материалы и методы

Материалы и условия культивирования

В экспериментах использовали растения ячменя *Hordeum vulgare* L. двух сортов: Haruno Nijo и Akashinriki.

Семена ячменя *H. vulgare* сорта Haruno Nijo, размещенные в полиэтиленовом пакете, доставляли на РС МКС на борту грузового корабля «Прогресс-М56» 24 апреля 2006 г. После доставки на борт РС МКС укладка была размещена около оранжереи «Лада» в служебном модуле МКС. 31 августа 2006 года командир 13-й основной экспедиции на МКС П.В. Виноградов посадил семена ячменя в корневой модуль оранжереи «Лада». Рост и развитие растений проходили при круглосуточном освещении, колебаниях температуры 22-27 °С и относительной влажности 40-60 %. Через 26 дней культивирования проростки срезали, помещали в раствор RNAlater RNA stabilization reagent (Qiagen, USA), предотвращающий деградацию мРНК в образцах, и спускали на Землю на борту транспортного корабля «Союз-ТМА-8». Через сутки после срезки растения доставляли в лабораторию на Земле и помещали в холодильник при -80 °С. Контрольные растения культивировали на Земле в аналогичных условиях температуры, влажности и освещения.

Во втором эксперименте использовали семена ячменя *H. vulgare* карликового сорта Akashinriki. Семена доставили на МКС на борту транспортного корабля «Союз ТМА-12» 08 апреля 2008 г. 24 июля 2008 г. борт-инженер 17-й основной экспедиции на МКС О.Д. Кононенко посадил семена ячменя в корневой модуль оранжереи «Лада». Рост и развитие растений проходили при круглосуточном освещении, колебаниях температуры 21-26 °С и относительной влажности 40-65 %. 25 августа 2008 г. проростки срезали и зафиксировали на борту МКС в холодильнике MELFI при -80 °С. Замороженные растения доставили на Землю на борту космического корабля «Спей Шаттл» 12 декабря 2008 г. В качестве контроля

использовали растения того же сорта Akashinriki, выращенные в лаборатории на Земле.

Экспонирование семян

Для исследования способности к выживанию в условиях открытого космоса семян растений использовали аппаратуру «Биориск-МСН» (рис. 7), которая представляет собой контейнер, содержащий 24 пластиковые чашки Петри диаметром 65 мм. В чашках размещали семена в хлопчатобумажных мешочках. На крышке каждой чашки имелись отверстия диаметром 10 мм, на которые наложен пористый фторлоновый фильтр, пропускающий воздух, но обеспечивающий стерильность образцов. 16 февраля 2007 г. было произведено снаряжение тест-объектами контейнеров аппаратуры «Биориск-МСН». Оборудование «Биориск-МСН» было доставлено на борт РС МКС 15 апреля 2007 г. на космическом корабле «Союз-ТМА-10». 06 июня 2007 г. во время внекорабельной деятельности (ВКД) российские космонавты Ф.Н. Юрчихин и О.В. Котов установили аппаратуру «Биориск-МСН» на внешней стороне МКС. Контейнеры были закреплены на специальной платформе, на внешней оболочке стыковочного узла «Пирс» (рис. 7). Перед закреплением у каждого контейнера открывалась крышка. Съем первого контейнера был осуществлен через 13 мес. - 15 июля 2008 г. космонавтами 17-ой основной экспедиции С.А. Волковым и О.Д. Кононенко. На Землю контейнер был спущен 24 октября 2008 г. Дальнейший анализ проводили в лаборатории на Земле.

Метод ДНК-микрочипов

Микрочипирование проводили с использованием ДНК-микрочипа Affymetrix, который содержит 23000 олигонуклеотидов, комплементарных последовательностям генов ячменя, в соответствии со стандартным протоколом (www.affymetrix.com). Полный профиль экспрессии расположен на http://proteogenomics.musc.edu/ma/uArrDB_download.php?u=%28owner%29%20Shagimardanova&fn=AnalysisData_Barley.xls&p=uArrDB_2/Shagimardanov a/spacebarley/052107/AnalysisData_Barley.xls.

ПЦР-РВ

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили с использованием реакционной смеси SYBR premix Taq (Takara Bio, Япония) на амплификаторе LightCycler 2.0 (Roche Applied Science). Смесь для ПЦР-РВ, общим объемом 20 мкл, содержала 2 мкл одноцепочечной кДНК, 10 мкл SYBR premix Taq (Takara Bio, Japan) и 0,2 мкМ каждого праймера. ПЦР-РВ проводили при следующих условиях: начальная денатурация при 95 °С, 10с, 40 циклов, включающих 20с при 95 °С и 20с при 60 °С. Оценивали уровень мРНК и количество копий генов в режиме относительных измерений ($\Delta\Delta C_t$ -метод) [Cantero et al., 2006]. Нормирование данных выполняли относительно гена α -тубулина. Для подтверждения уникальности обнаруженных продуктов амплификации, по окончании каждой реакции анализировали кривую плавления продукта ПЦР.

Праймеры подбирали с помощью программного обеспечения LightCycler 4.0 Software (Roche Applied Science). Праймеры выбирали так, что они соответствовали кодирующим областям генов.

Полиморфизм длины амплифицированных фрагментов рескрипции (ПДАФ)

ПДАФ проводили как описано Vos et al., 1995. Продукты амплификации разделялись с помощью денатурирующего ПААГ – электрофореза с использованием ExcelGel DNA Analysis Kit (GE Healthcare, Sweden) на Multiphor II Electrophoresis Unit (GE Healthcare, Sweden). Для визуализации фингерпринта использовали серебряный краситель PlusOne DNA Silver Staining kit (GE Healthcare, Sweden) согласно инструкции.

Математическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ LightCycler 4.0 Software (Roche Applied Science) путем расчета среднеквадратичного отклонения (σ). Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении $\sigma < 10\%$. В качестве критерия достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $P \leq 0.05$ за достоверный уровень значимости.

Результаты и их обсуждение

I. Особенности роста и экспрессии генов ячменя сорта Haruno Nijo в условиях космического полета

Более 90% семян сорта Haruno Nijo, отправленных на МКС в 2006 году, проросли через 3 дня после посадки и увлажнения корнеобитаемой среды, что указывает на сохранение высокой жизнеспособности семян этого сорта, несмотря на 4-х месячное нахождение на орбите. Рост и развитие растений ячменя в условиях космического полета (рис. 1) и на Земле не отличались. Прорастание семян в обоих случаях зарегистрировано на 3-и сутки после посадки. Высота побегов в космических и земных условиях достигала 50-60 см, кроющий лист открылся на 26 день. Таким образом, развитие растений ячменя в космосе проходило идентично развитию в нормальных земных условиях. Многие другие виды растений, с которыми проводились эксперименты по выращиванию в условиях невесомости в оранжерее «Лада», демонстрировали сходные результаты (Гостимский с соавт, 2007; Левинских с соавт, 2005, Левинских, 2002).



Рис. 1. Рост ячменя *H. vulgare* сорта Haruno Nijo в оранжерее «Лада» на борту МКС.

Отсутствие регистрируемых фенотипических изменений говорит об эффективной адаптации растительных организмов к условиям космического полета. С целью выяснения механизмов адаптации провели анализ полного транскриптома растений ячменя с использованием ДНК-микрочипов. Обнаружено более 1000 генов, экспрессия которых изменилась более чем в два раза в условиях МКС. С учетом вовлечения каждого гена в определенный биологический процесс они были подразделены на 8 групп: гены, участвующие в метаболизме аминокислот, ДНК репликации, биосинтезе и созревании белков, энергетическом обмене, фотосинтезе, транспорте, передаче сигналов и ответе на стресс. Причем, значительно снижалась

транскрипция генов белков, вовлеченных в процесс фотосинтеза. Среди них, гены хлорофилл-связывающих белков, компонентов фотосистемы I и фотосистемы II, гены хлорофиллсинтазы и хлорофиллредуктазы. Кроме того, уменьшалось количество транскриптов генов белков, связанных с переносом электронов, а именно цитохромов, ферредоксинов, ферредоксиноксидоредуктаз, рибулозобисфосфаткарбоксилазы. Полученное уменьшение экспрессии генов белков, участвующих в фотосинтезе коррелирует с результатами экспериментов по выращиванию арабидопсиса в условиях космического полета на космическом корабле “Columbia” в 1999г., в которых было показано значительное уменьшение экспрессии генов фотосистемы II (Paul et al., 2005). В нашем эксперименте обнаружено накопление транскриптов генов факторов сплайсинга, пептидазы, участвующей в процессинге митохондриальных белков-предшественников, факторов элонгации трансляции. Напротив, в растениях арабидопсиса описано понижение экспрессии потенциального гена фактора элонгации пептидов eF-1 (Paul et al., 2005). Наблюдаемое изменение экспрессии генов белков, участвующих в передаче сигналов, также согласуется с данными литературы. В растениях арабидопсиса показано уменьшение синтеза мРНК факторов транскрипции, включая белки, регулируемые этиленом, а также белки, вовлеченные в процессы старения. При этом в растениях индуцировалась транскрипция генов, вовлеченных в передачу сигналов при помощи ионов Ca^{2+} (Paul et al., 2005).

В нашей работе обнаружено значительное накопление транскриптов белков стрессового ответа. Среди них выделили три группы генов, а именно гены белков теплового шока (БТШ), гены белков, нейтрализующих активные формы кислорода (АФК) и гены патогенез-связанных (PR – от англ. **P**athogenesis **R**elated) белков.

Для корректного и точного исследования изменений в уровне экспрессии генов провели анализ транскрипции с помощью ПЦР в реальном времени. В ячмене сорта Haguro Nijo, культивировавшемся на борту МКС, при анализе

методом ПЦР-РВ не выявили увеличенной экспрессии генов БТШ: *hsp 17*, *hsp18* и *hsp 26*. Такие же результаты получены относительно растений, подвергшихся действию солевого стресса. Напротив, после воздействия повышенных температур биосинтез мРНК этих генов увеличился в сотни раз (рис. 2).

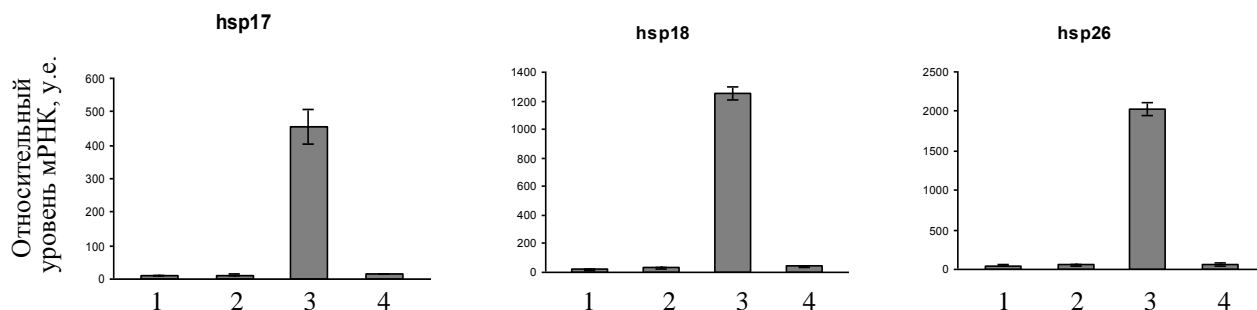


Рис. 2. Изменение уровня мРНК генов, кодирующих низкомолекулярные БТШ при различных условиях стресса по сравнению с уровнем мРНК при нормальных земных условиях роста ячменя *H. vulgare* сорта Haguro Nijo. 1-Контроль, 2 – Космическая среда, 3 – Тепловой шок, 4 – Солевой стресс. Hsp17 – белок теплового шока 17, Hsp18 – белок теплового шока 18, Hsp26 – белок теплового шока 26

Таким образом, показано, что космический полет не влияет на биосинтез малых БТШ в ячмене. Ранее показано, что гены, кодирующие некоторые БТШ, индуцируются в культуре клеток животных (Hammond et al., 2000) и растениях *A. thaliana* (Paul et al., 2005) в условиях космического полета. Анализ методом ПЦР-РВ позволил выявить индукцию 11 генов БТШ в растениях арабидопсиса после полета на космическом корабле «Columbia» (Paul et al., 2005).

Существуют работы, подтверждающие изменение профиля экспрессии генов БТШ в условиях искусственной гипогравитации (Martzivanou et al., 2003). В экспериментах с использованием одноклеточной системы - семени папоротника, методом ДНК-микрочипов получен эффект как индукции, так и репрессии генов БТШ. Авторы предположили, что наблюдаемые изменения в экспрессии могут указывать на возможную роль БТШ в восприятии гравитационного сигнала (Salmi et al., 2008).

Белки Hsp70 и Hsp90 выполняют ряд важных функций, как при развитии растений в нормальных условиях, так и в стрессовых ситуациях (Vásquez-Robinet et al., 2010). В наших экспериментах при воздействии всех трех видов стресса (космический полет, тепловой шок, солевой стресс) уровень экспрессии этих генов увеличился. Причем, минимальное увеличение наблюдалось в случае

космического стресса (рис. 3) Обнаруженное накопление транскриптов генов *hsp70* и *hsp90*, скорее всего, не является результатом специфического ответа на влияние факторов космического полета, а указывает на наличие общего стрессового состояния организма и мобилизацию его внутренних ресурсов. Ранее показано накопление стрессового белка Hsp72 в тканях золотой рыбки в

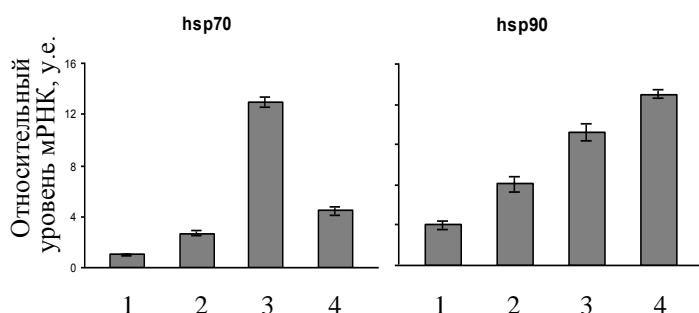


Рис. 3. Изменение уровня мРНК генов, кодирующих белки теплового шока *hsp70* и *hsp90* по сравнению с уровнем мРНК при нормальных земных условиях роста ячменя *H. vulgare* сорта Haruno Nijo. 1-Контроль, 2 – Космическая среда, 3 – Тепловой шок, 4 – Солевой стресс.

условиях космического полета (Ohnisi et al., 1998).

Расхождение полученных данных и данных литературы может быть объяснено использованием

разного оборудования и, соответственно, различий в условиях и продолжительности культивирования.

Количество PR-белков увеличивается в растениях в ответ на атаку патогенов. В последние годы стали появляться доказательства того, что белки этого семейства также участвуют в ответе на различные виды стресса, в частности, на присутствие тяжелых металлов, повышение концентрации сахаров в среде, засуху (Yun et al., 1999; Pääkkönen et al., 1998). В нашем исследовании не выявлено индукции экспрессии генов PR-белков в условиях космического полета, за исключением гена *PR2* (рис. 4). *PR2* белок относится к β -1,3-эндоглюканазам, катализирующим гидролитическое расщепление β -1,3-глюканов, представленных в клеточных стенках многих грибов (Rop et al., 2009). Показано, что экспрессия гена *PR2* индуцируется некоторыми видами стресса абиотической природы, в т.ч. повышенными концентрациями озона в среде (Eskey-Kaltenbach et al., 1992, Grimmig, 2003 Thalmair et al., 1996). Возможно, усиление транскрипции гена *PR2* ячменя сорта Haruno Nijo связано с индукцией окислительного стресса на борту МКС.

Показано значительное увеличение количества мРНК *PR*-генов при повышении концентрации соли в среде, что может указывать на их участие в

регуляции ответов на солевой или осмотический стрессы, связанные с оттоком воды из клеток (рис. 4). Недавно, индукция генов PR-белков *PR3*, *PR4* и *PR5* была обнаружена в растениях *A. thaliana* под воздействием солевого стресса (Seo et al., 2008).

Следует отметить, что исследования экспрессии генов в растениях, культивировавшихся в условиях космического полета, как длительного, так и кратковременного, никогда не затрагивали анализа группы PR-белков. Таким образом, полученные данные являются приоритетными в мировой науке.

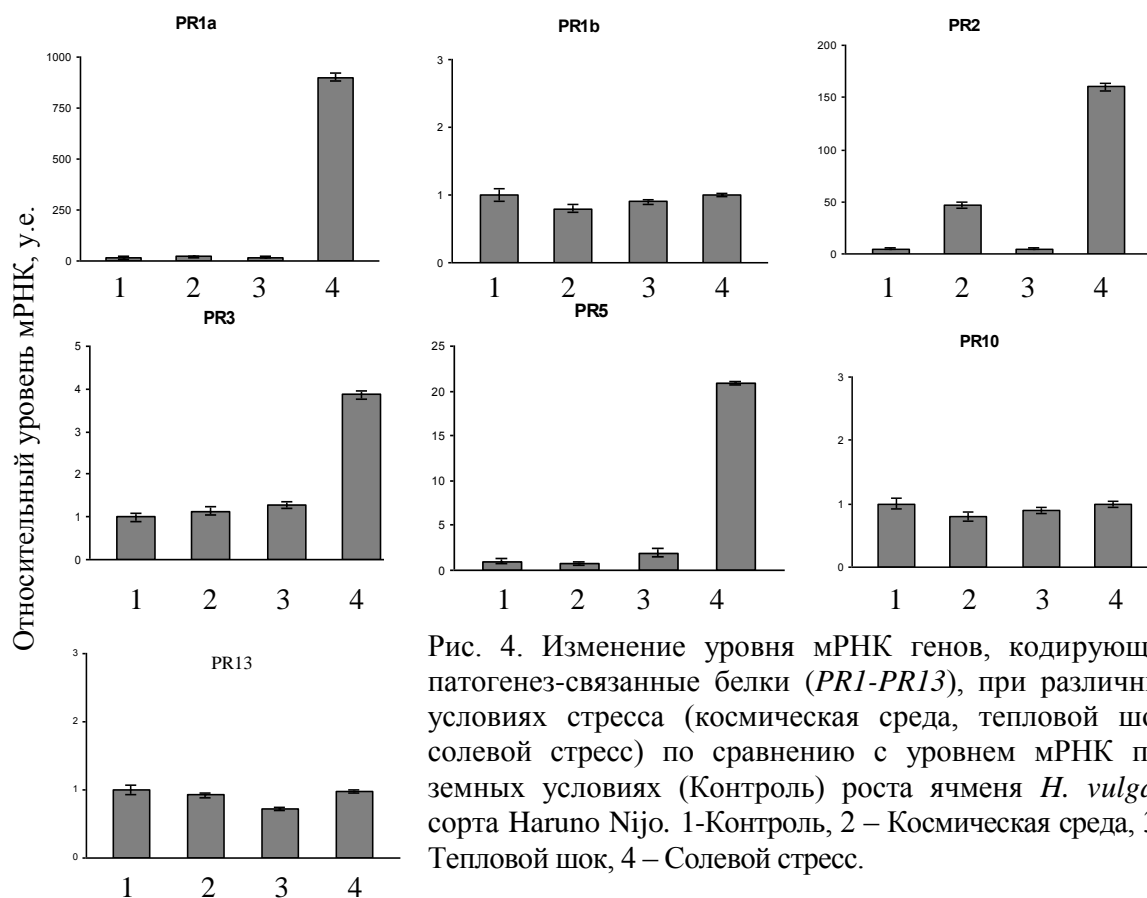


Рис. 4. Изменение уровня мРНК генов, кодирующих патогенез-связанные белки (*PR1-PR13*), при различных условиях стресса (космическая среда, тепловой шок, солевой стресс) по сравнению с уровнем мРНК при земных условиях (Контроль) роста ячменя *H. vulgare* сорта Naruno Nijo. 1-Контроль, 2 – Космическая среда, 3 – Тепловой шок, 4 – Солевой стресс.

Неотъемлемой частью космических полетов является воздействие повышенных доз радиации на живые организмы. Одним из наиболее опасных воздействий радиации является продукция АФК, включая супероксиданион O_2^- , гидроксил радикал $\cdot OH$ и пероксид водорода H_2O_2 . (Fang et al., 1991). Такое накопление АФК может вызывать разрывы ДНК, инактивацию некоторых ферментов, перекисное окисление липидов. Накопление АФК в

клетках растений приводит к мобилизации защитных сил организма путем повышения синтеза белков, способных инактивировать АФК.

В листьях ячменя, который культивировался на борту МКС, мы обнаружили повышенный уровень транскрипции генов, кодирующих основные белковые компоненты системы антиоксидантной защиты клеток. Уровень мРНК гена супероксиддисмутазы (*sod*) был в 6 раз выше в космической среде по сравнению с земными условиями. Экспрессия гена глутамилтрансферазы (*gst*) увеличилась в космосе в 24 раза. Транскрипция гена каталазы (*cat*) увеличилась в 18 раз, гена аскорбатпероксидазы (*apx*) в 3 раза в космических условиях по сравнению с земным контролем. Даже солевой стресс, как известный индуктор увеличения биосинтеза антиоксидантных ферментов, привел к значительно меньшему накоплению этих транскриптов (рис. 5). Ранее показано, что продукция АФК и активность ферментов-антиоксидантов увеличивается в условиях искусственной микрогравитации в клиностате (Li et al., 2004).

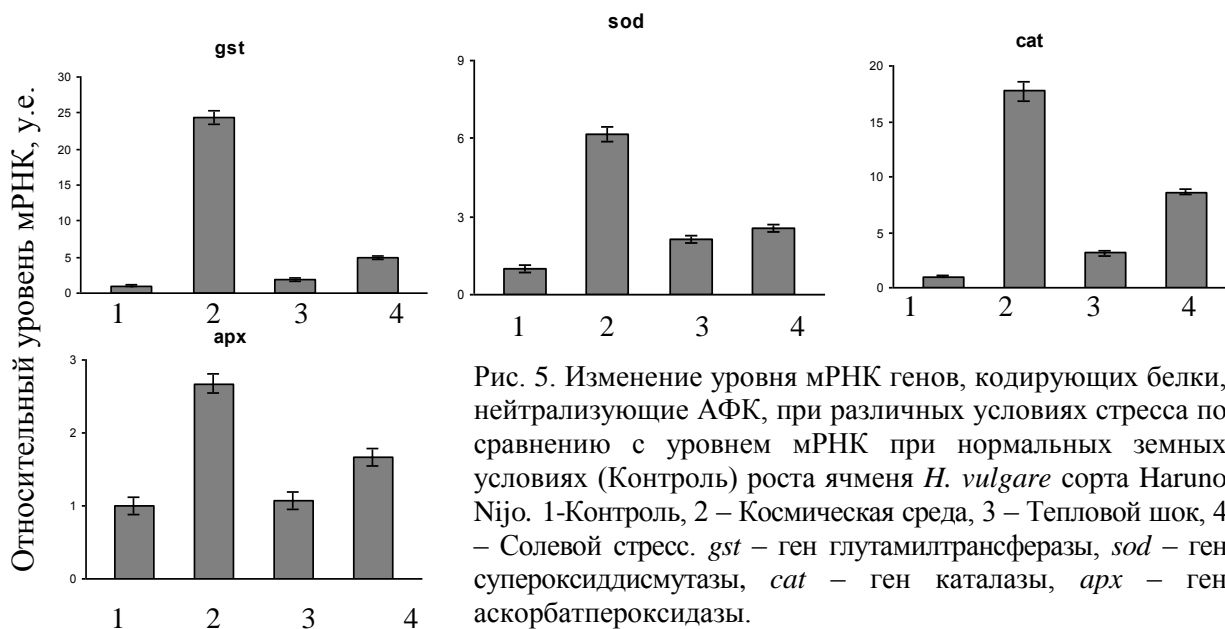


Рис. 5. Изменение уровня мРНК генов, кодирующих белки, нейтрализующие АФК, при различных условиях стресса по сравнению с уровнем мРНК при нормальных земных условиях (Контроль) роста ячменя *H. vulgare* сорта Haguro Nijo. 1-Контроль, 2 – Космическая среда, 3 – Тепловой шок, 4 – Солевой стресс. *gst* – ген глутамилтрансферазы, *sod* – ген супероксиддисмутазы, *cat* – ген каталазы, *apx* – ген аскорбатпероксидазы.

Вероятность наличия окислительного стресса на борту космических летательных аппаратов неоднократно высказывалась многими исследователями (Horneck G. 1992). В нашем исследовании впервые показано увеличение

транскрипции генов белков, участвующих в элиминации АФК из клеток растений в условиях реального космического полета. Это может служить косвенным доказательством наличия факторов, вызывающих окислительный стресс у растений на борту МКС. Вопрос о природе этого компонента космического полета остается открытым. Наиболее вероятной причиной является космическая радиация и микрогравитация. Также, следует отметить, что космическая станция является закрытой системой с постоянно меняющимся газовым составом среды, коррелирующим с частотой пристыковок транспортных и грузовых кораблей к МКС. Полученные данные вносят вклад в понимание реакций живых организмов в ответ на космический стресс

Таким образом, результаты, представленные в работе, выявили изменение экспрессии части генов ячменя сорта Nagano Nijo в ответ на факторы космического полета.

II. Закономерности экспрессии генов ячменя сорта Akashinriki в условиях космического полета

В 2008 году мы проводили эксперимент по выращиванию ячменя *H. vulgare* карликового сорта Akashinriki в оранжерее «Лада» на борту РС МКС. Растения культивировали в оранжерее в течение 32-х суток. Высота ячменя достигала 30 см, как в случае полетных растений, так и в контрольном варианте. Количество биомассы экспериментальных и контрольных растений было сопоставимо. Никаких видимых отличий растений, выращенных в невесомости и на Земле, обнаружено не было. Таким образом, эксперимент 2008 года подтверждает ранее полученные данные об отсутствии влияния факторов космического полета на рост и развитие ячменя *H. vulgare*.

Растения ячменя были заморожены при -80 °C непосредственно после их срезки на борту МКС. Транспортировка на Землю также осуществлялась при -80 °C на борту КК «Спейс Шаттл». Благодаря этому, в данном эксперименте удалось устранить факторы, которые потенциально влияли на результаты исследований при анализе экспрессии генов. К ним, в первую очередь, относятся

прижизненные изменения после извлечения растений из оранжереи, а также перегрузки при приземлении, длительность транспортировки. Улучшение технической оснащенности позволило исследовать реакцию растений на условия культивирования на борту РС МКС. Был проведен анализ экспрессии генов стрессового ответа методом ПЦР-РВ. Количество транскриптов генов теплового шока не изменялось по сравнению с контрольными растениями (рис. 6а). Условия космического полета не оказали влияния на транскрипцию генов большинства PR-белков (рис. 6б). Как и в эксперименте с использованием в качестве тест-объекта растений ячменя сорта Naruni Nijo, экспрессия гена *PR2* была увеличена в ячмене сорта Akashinriki в условиях МКС. Учитывая тот факт, что в ячмене сорта Akashinriki не обнаружено индукции белков-антиоксидантов, можно предположить, что ген *PR2* индуцируется условиями космического полета. С другой стороны, ген *PR2* относится к группе индуцибельных генов и повышение уровня экспрессии только в 13 раз не является значительным. Среди белков, нейтрализующих активные формы кислорода, наблюдалось только увеличение экспрессии гена *gst* в 3 раза по сравнению с контролем (рис. 6в). В предыдущем эксперименте уровень транскрипции *gst* увеличивался в 24 раза в ответ на условия космического полета (рис. 5). При анализе экспрессии генов супероксиддисмутазы, каталазы и аскорбатпероксидазы не получено статистически достоверных отличий опытных и контрольных растений (рис 6в).

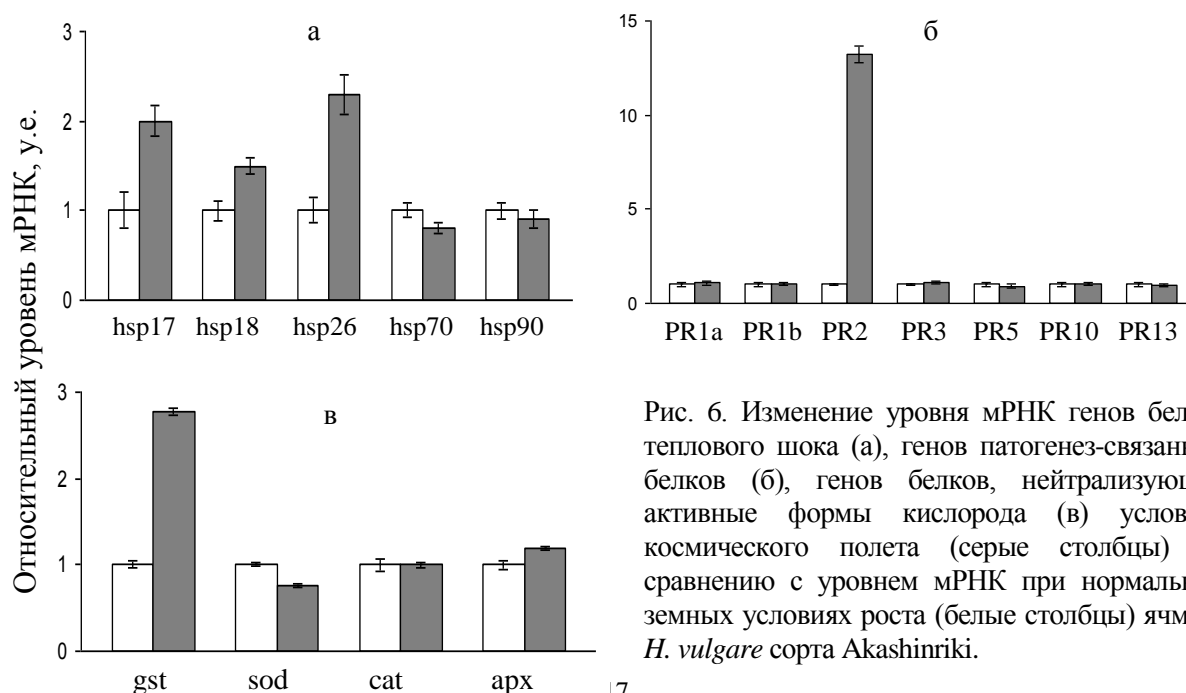


Рис. 6. Изменение уровня мРНК генов белков теплового шока (а), генов патогенез-связанных белков (б), генов белков, нейтрализующих активные формы кислорода (в) условиях космического полета (серые столбцы) по сравнению с уровнем мРНК при нормальных земных условиях роста (белые столбцы) ячменя *H. vulgare* сорта Akashinriki.

Результаты данного эксперимента можно рассматривать, как впервые полученные данные по оценке реального состояния организма растений ячменя, выращенных в космической оранжерее на борту орбитальной станции.

Наши результаты согласуются с данными, полученными Stutte et al (2006). Среди 820 генов растений карликовой пшеницы, культивировавшейся на борту МКС в 2002 г. в оранжерее «Biomass production system» не было обнаружено дифференциальной экспрессии определенного гена или группы генов.

Таким образом, условия космического полета, а также специфические условия замкнутого гермообъема, не вызывали увеличения экспрессии генов стрессового ответа у растений ячменя сорта Akashinriki. Эти результаты показывают, что условия космического полета и, в частности, отсутствие гравитационного стимула не являются стрессовыми факторами для растительного организма в случае обеспечения его всем необходимым для роста и развития.

III. ДНК-повреждающее действие факторов открытого космического пространства на покоящиеся формы высших растений

Для определения границ выживаемости и установления мутагенного эффекта факторов открытого космического пространства проводили эксперимент «Биориск». В рамках эксперимента семена растений ячменя и риса подвергали экспозиции в течение 13 месяцев на внешней поверхности РС МКС в аппаратуре «Биориск-МСН» (рис. 7).

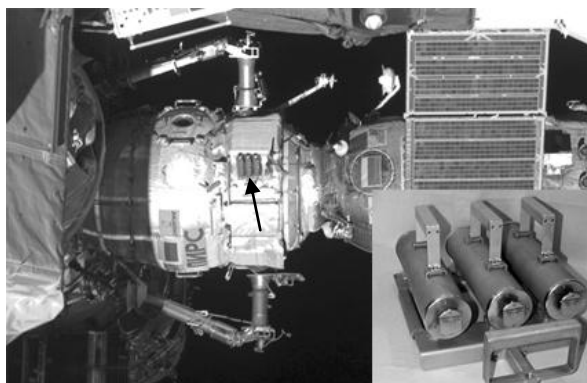


Рис. 7. Аппаратура «Биориск-МСН» и ее расположение (указано стрелкой) на стыковочном узле «Пирс».

Показано, что семена высших растений сохранили жизнеспособность после 13 мес. экспозиции в космическом

пространстве. Всхожесть семян составила 82% (41/50) для семян ячменя Haruno Nijo и 98% (49/50) для семян ячменя Akashinriki. 41 растение Haruno Nijo и 49 растений Akashinriki развивались нормально и не имели отклонений

в морфологических и физиологических свойствах растений в сравнении с растениями, выросшими из контрольных семян (рис. 8).



Рис. 8. Растения ячменя сорта Haruno Nijo первого поколения из семян, экспонированных в условиях открытого космоса в течение 13ти месяцев (слева) и контрольные растения (справа).

Всхожесть семян риса составляла 44 % (22/50) для сорта риса SAS и 44% (23/50) для сорта KAS. Однако только 9 проросших семян сорта SAS оказались жизнеспособны и в дальнейшем развились в нормальные растения, все остальные проростки погибли, как и все проросшие семена сорта KAS. При сравнительном анализе выживших растений риса, как и в случае с ячменем, статистически достоверных отклонений в морфологических и физиологических свойствах растений из космического эксперимента и контроля обнаружено не было.

Подход, при котором оценивается прораствание семян, экспонированных в открытом космосе, выживаемость изменение морфологии проростков не применим для определения потенциальных механизмов повреждения. Для выявления ДНК-повреждающего действия космического пространства, мы провели оценку мутационных изменений методом ПДАФ. Данный подход позволяет одновременно проводить анализ большого числа генетических локусов в одном эксперименте и обеспечивает высокую стабильность и воспроизводимость характера распределения полос в ПААГ геле. 16 различных пар праймеров использовали для анализа полиморфизма у растений ячменя и 8 пар праймеров для анализа полиморфизма растений риса. В общем около 140 полос было получено для растений ячменя (рис. 9) и 135 для растений риса (рис. 10), ни одна из которых не выявила полиморфизма между экспонированными в космосе и контрольными вариантами растений.

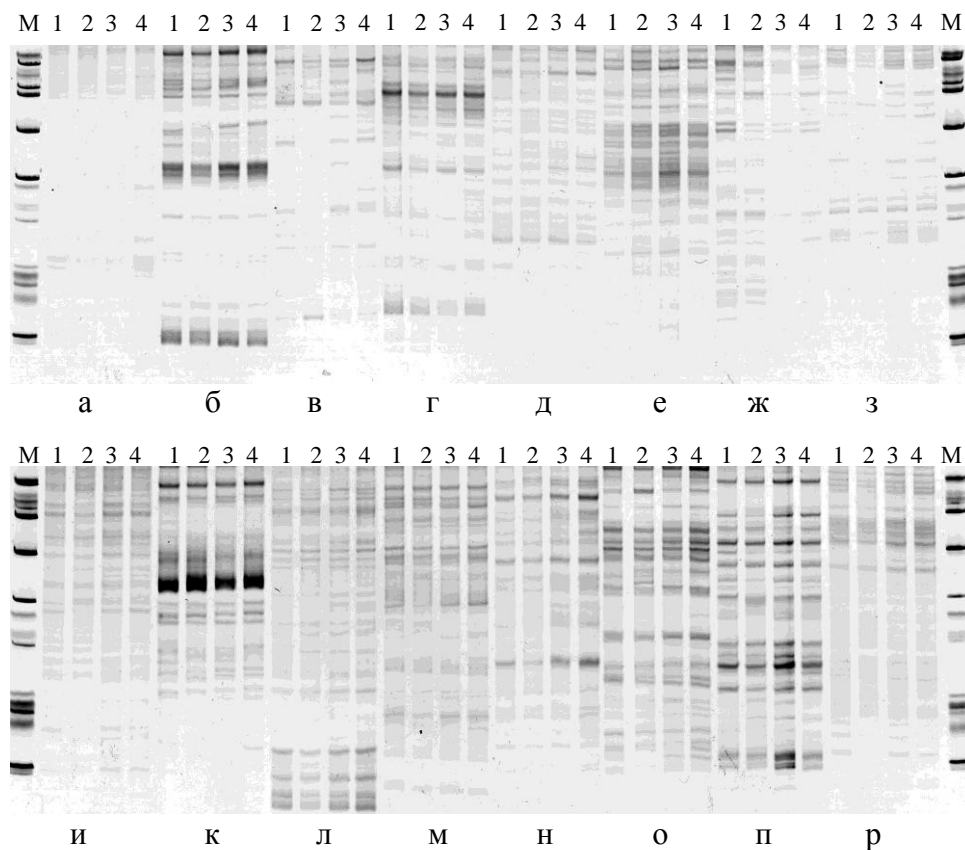


Рис. 9. Анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) растений первого поколения из семян ячменя, экспонировавшихся на внешней поверхности МКС в аппаратуре «Биориск» в условиях открытого космического пространства. «а-р» различные пары праймеров, используемые для амплификации. 1- ДНК контрольного «земного» растения, 2-4 – ДНК «космических растений», М - маркеры.

Полученные данные подтверждают, что условия космического пространства не оказывают генотоксического эффекта и не вызывают ДНК мутаций в сухих семенах ячменя и риса.

Таким образом, можно заключить, что летальный эффект космического пространства на некоторые семена объясняется не накоплением мутаций в геноме, а критическим действием температуры, вызванной солнечным излучением. Среди выживших семян, наследуемых мутаций не обнаружено.

Анализируя условия экспонирования на внешней стороне РС МКС в данном эксперименте, следует констатировать, что нагрев контейнеров во время экспозиции был высок. На основании косвенных данных можно предположить, что нагрев пластиковых чашек достигал 95 °С, т.к. именно при этой температуре в модельном эксперименте отмечена их деформация

(Новикова с соавт., 2009), имеющая место в нашем эксперименте. В вакууме передача тепла осуществляется при контакте материалов, которые обладают различной теплопроводностью. В данном случае можно предположить, что пакеты из хлопчатобумажной ткани оказались хорошим теплоизолятором и нагрев тест-объектов, находящихся внутри пакетов, не был столь высоким. В работе показано, что семена ячменя способны сохранять высокую жизнеспособность после 13ти месяцев экспонирования на внешней поверхности МКС, несмотря на избыточную температуру и другие факторы космического пространства. Этот показатель для семян риса был значительно ниже, однако выжившие семена прорастали и давали растения по генетическим и морфологическим свойствам не отличающиеся от контрольных растений.

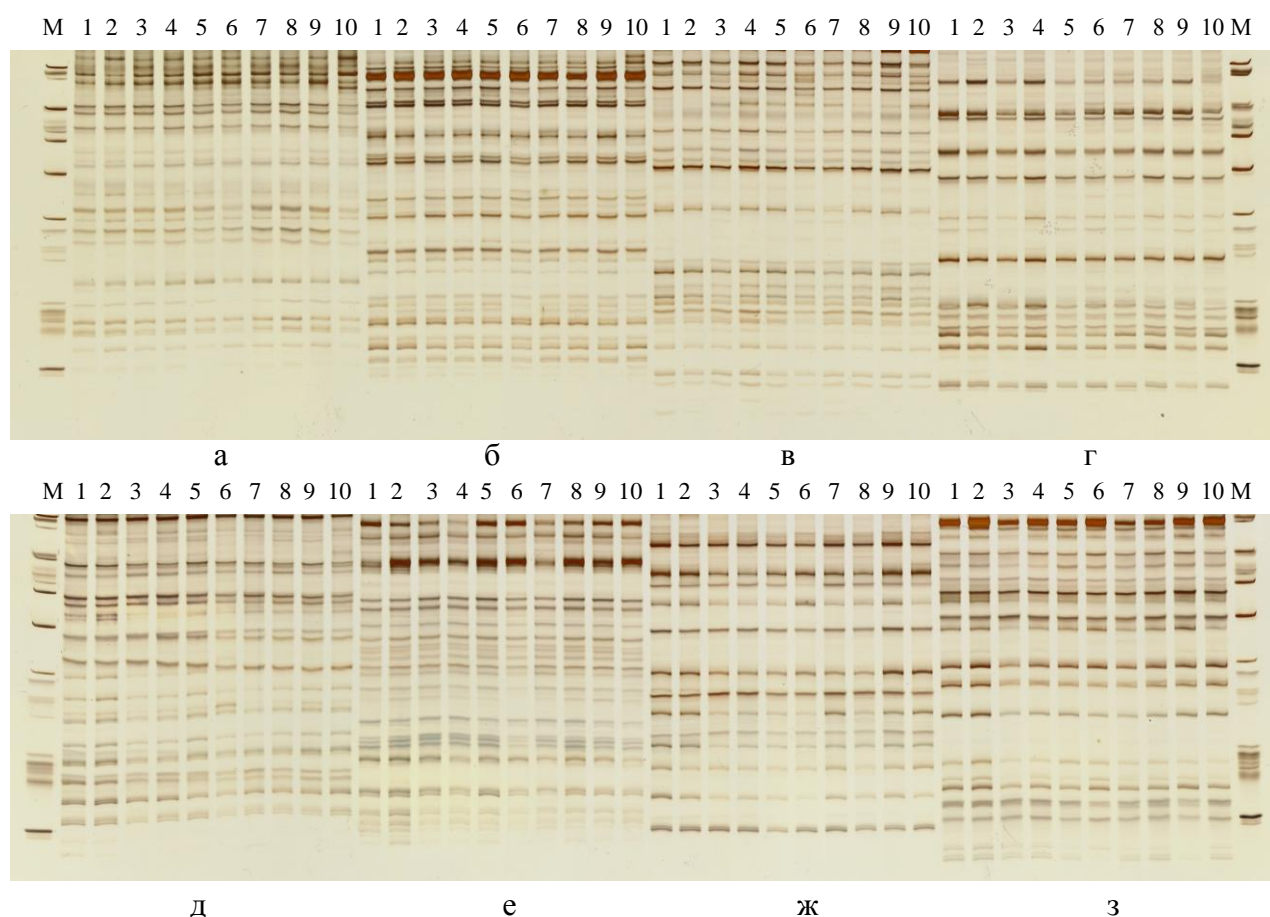


Рис. 10. Анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) растений первого поколения из семян риса после экспозиции на внешней поверхности МКС в аппаратуре «Биориск» в условиях открытого космического пространства. «а-з» различные пары праймеров, используемые для амплификации. 1- ДНК контрольного «земного» растения, 2-9 – ДНК «космических растений», М - маркеры.

Таким образом, показано, что культивирование растений ячменя на борту МКС вызывает изменение экспрессии многих генов. В ячмене сорта Haruno Nijo показано значительное увеличение транскрипции генов, элиминирующих АФК из клеток. По-видимому, включаются защитные механизмы от воздействия факторов, сопутствующих космическому полету, в частности радиации и газовому составу замкнутого объема орбитальной станции. В растениях ячменя сорта Akashinriki накопления транскриптов генов-антиоксидантов, как и других генов стрессового ответа не обнаружено. Таким образом, данный сорт может быть рекомендован для дальнейшего использования в оранжереях на борту летательных аппаратов. Длительное экспонирование семян ячменя на внешней поверхности РС МКС не привело к накоплению мутационных изменений и значительному снижению жизнеспособности потомства первого поколения. У растений риса не обнаружено полиморфизма, однако жизнеспособность растений снижена более чем в два раза. Таким образом, согласно полученным нами данным, растения ячменя являются перспективными и обладают потенциалом использования в качестве компонентов жизнеобеспечения для полетов на дальние расстояния.

ВЫВОДЫ

1. Растения ячменя *H. vulgare* не подвержены фенотипическим изменениям при культивировании на борту МКС. Установлено, что у них модулируется экспрессия более 1000 генов, вовлеченных в метаболизм аминокислот, ДНК репликацию, биосинтез и созревание белков, энергетический обмен, фотосинтез, транспорт, передачу сигналов и ответ на стресс.
2. Условия космического полета на борту МКС в 2006 году привели к индукции транскрипции генов ферментов-антиоксидантов: глутамилтрансферазы, супероксиддисмутазы, каталазы и аскорбатпероксидазы - в 24, 6, 18 и 3 раза, соответственно в растениях ячменя *H. vulgare* сорта Haruno Nijo.

3. Экспрессия генов стрессового ответа ячменя *H. vulgare* карликового сорта Akashinriki значимо не изменяется в ответ на воздействие факторов окружающей среды на МКС в 2008 г.
4. 13-ти месячное экспонирование покоящихся форм растений в условиях открытого космического пространства не приводит к изменению фенотипа растений и не влияет на степень полиморфизма ДНК.
5. Ячмень *H. vulgare* является высокоперспективным для использования на борту космических летательных аппаратов в качестве компонента систем жизнеобеспечения.

Работы, опубликованные по теме диссертации

1. **Шагимарданова Е.И.** Анализ экспрессии генов стрессового ответа ячменя *Hordeum vulgare* в условиях космического полета / Е.И. Шагимарданова, О.А. Гусев, В.Н. Сычев, М.А. Левинских, М.Р. Шарипова, О.Н. Ильинская, Г. Бингхэм, М. Сугимото // Молекулярная Биология. – 2010. – Т. 44 (5). – С. 1-9.
2. **Shagimardanova E.I.** Oxidative stress and antioxidant capacity in barley grown under space environment / E.I. Shagimardanova, O.A. Gusev, G. Bingham, M.A. Levinskikh, V.N. Sychev, Z. Tiansu, M. Kihara, K. Ito, M. Sugimoto // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2010. – V. 74 (7). – P. 1479-1482.
3. **Шагимарданова Е.И.** Экспрессия генов стрессового ответа ячменя *Hordeum vulgare* выросшего на борту международной космической станции / Е.И. Шагимарданова, О.А. Гусев, В.Н. Сычев, М.А. Левинских, М.Р. Шарипова, М. Сугимото // Ученые записки Казанского государственного университета. Серия «Естественные науки». – 2010. – Т. 152 (1). – С. 166-173.
4. Sugimoto M. Gene expression of barley grown in space. M. Sugimoto, **E.I. Shagimardanova**, O.A. Gusev, M.A. Levinskikh, V.N. Sychev, A.V. Grigoriev // Space Utilization Research. – 2008. – V. 24. – P. 412-414.
5. **Shagimardanova E.I.** Expression of stress/defense-related genes in barley grown under space environment / E.I. Shagimardanova, O.A. Gusev, M.A. Levinskikh, V.N. Sychev, M. Sugimoto // 14th international conference “Microbial enzymes in biotechnology and medicine”. Abstract book. – Kazan. – Russia. - 2009. - P. 116-117.
6. **Шагимарданова Е.И.** Протеом ячменя *Hordeum vulgare* в условиях космического полета на МКС / Е.И. Шагимарданова, О.А. Гусев, В.Н. Сычев, М.А. Левинских, М.Р. Шарипова, М. Сугимото // IV Российский симпозиум «Белки и пептиды». Сборник тезисов. – Казань. - Россия. – 2009. – С. 113

7. . **Shagimardanova E.I.** Space environment in international space station is not stressful for barley. E.I. Shagimardanova, O.A. Gusev, G. Bingham, M.A. Levinskikh, V.N. Sychev, I. Podolsky, M. Sugimoto // 17th IAA Human in Space Symposium. Abstract book. – Moscow. – Russia. – 2009. – P. 114-115.
8. **Шагимарданова Е.И.** Влияние открытого космического пространства на выживаемость семян ячменя / Е.И. Шагимарданова, О.А. Гусев, В.Н. Сычев, М.А. Левинских, М. Сугимото, М.Р. Шарипова / IX Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века". Сборник тезисов. – Казань. – Россия. – 2009. – С. 94.
9. **Шагимарданова Е.И.** Экспрессия генов белков-антиоксидантов ячменя *Hordeum vulgare* под воздействием солевого стресса / Е.И. Шагимарданова, М. Сугимото, О.А. Гусев, М.Р. Шарипова // XXII Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология наука XXI века». Сборник тезисов. – Пущино. – Россия. – 2008. – С. 61-62.
10. **Шагимарданова Е.И.** Экспрессия генов теплового шока ячменя *Hordeum vulgare* в условиях роста на международной космической станции / Е.И. Шагимарданова, М. Сугимото, О.А. Гусев, В.Н. Сычев, М.А. Левинских, М.Р. Шарипова // II Международная научно-практическая конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». Сборник тезисов. – Казань. – Россия. – 2008. – С. 144-145.
11. **Шагимарданова Е.И.** Экспрессия *hsp*s – генов ячменя *Hordeum vulgare* под воздействием солевого стресса / Е.И. Шагимарданова, М. Сугимото, О.А. Гусев, М.Р. Шарипова // Конференция НОЦ КГУ Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века». Сборник тезисов. – Казань. – Россия. – 2008. – С. 96.
12. Sugimoto M. Expression of stress/defense-related genes in barley grown under space environment. M. Sugimoto, **E.I. Shagimardanova**, O.A. Gusev, G. Bingham, M.A. Levinskikh, V.N. Sychev // 37th COSPAR Scientific Assembly. Abstract book – Montreal. – Canada. – 2008. – P. 46.
13. Sugimoto M. Growth and stress on barley in space environment / M. Sugimoto, **E.I. Shagimardanova**, O.A. Gusev, G. Bingham, M.A. Levinskikh, V.N. Sychev // 22th Annual meeting of Japanese Society for Biological Science in Space. Abstract book. – Nara. – Japan. – 2008. – P. 78-79.
14. **Shagimardanova E.I.** Expression of stress/defense-related genes in barley grown under space environment / E.I. Shagimardanova, M. Sugimoto, O.A. Gusev, G. Bingham, M.A. Levinskikh, V.N. Sychev // 114th Annual Meeting of Japanese Society of Breeding. Abstract book. – Shiga. – Japan. – 2008. – P. 112.